

土壤微生物群落磷脂脂肪酸 PLFA 生物标记多样性

张秋芳^{1,2}, 刘 波^{2,*}, 林营志², 史 怀², 杨述省², 周先冶²

(1. 中国科学院城市环境研究所, 厦门 361021; 2. 福建农业科学院农业生物资源研究所, 福州 350003)

摘要: 磷脂脂肪酸(PLFA)生物标记法是一种可定性和定量分析土壤中微生物群落多样性的方法。研究以烟田土壤为例, 应用生态学评价方法, 即丰富度(S)、均匀度(J)、Simpson 优势度(D)、Shannon-Wiener(H_1)、Brillouin(H_2)和 McIntosh(H_3)多样性指数等测度方法, 分析土壤中微生物群落 PLFAs 生物标记的多样性。研究表明, 供试土壤微生物群落中, 先后出现了 43 种 PLFAs, 将其聚类分析, 可以将所获得的 PLFAs 分成五大类: 第 I 类为高含量、高频次和多样性, PLFA 为 18:1 ω 9c 的真菌生物标记; 第 II 类为高含量、高频次和多样性, PLFA 为 16:0 的假单胞菌生物标记; 第 III 类为高含量、高频次, 多样性中等, PLFA 为 16:1 ω 5c 的甲烷氧化菌生物标记; 第 IV 类为中等含量, 频次较高, 多样性中等, 含有表征好氧菌的 i15:0、a15:0、i16:0 和 a17:0 的 PLFA, 还有表征厌氧菌的 18:1 ω 7c 以及硫酸盐还原菌的 16:0 10Me; 第 V 类为低含量, 低频次和多样性, 其特征生物标记有表征好氧菌的 i15:0 3OH、15:1 i G、a16:0、i16:1 G、i16:1 H、17:0、i17:0、15:0 2OH、15:0 3OH、17:0 和 17:0 2OH 的 PLFAs, 存在有表征真菌的 18:3 ω 6c (6, 9, 12)、放线菌的 17:0 10Me 和 18:0 10Me 以及表征原生动物的 20:4 ω 6, 9, 12, 15c。说明供试土壤中能够起主导作用的功能菌依次是真菌、假单胞菌、甲烷氧化菌和一部分的好氧菌、厌氧菌及硫酸盐还原菌, 将为合理调节土壤微生态系统提供指导, 是一种可行的评价土壤微生物群落多样性的新方法。

关键词: 土壤; 微生物群落; 磷脂脂肪酸(PLFA); 生物标记; 多样性

文章编号: 1000-0933(2009)08-4127-11 中图分类号: Q143 文献标识码: A

The diversity of phospholipid fatty acid (PLFA) biomarker for the microbial community in soil

ZHANG Qiu-Fang^{1,2}, LIU Bo^{2,*}, LIN Ying-Zhi², SHI Huai², YANG Shu-Sheng², ZHOU Xian-Zhi²

1 Institute of Urban Environment, Chinese Academy of Sciences, Xiamen 361021, China

2 Agricultural Bioresource Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China

Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(8): 4127 ~ 4137.

Abstract: As a kind of biomarker, phospholipid fatty acid (PLFA) was used to detect the microbial community diversity in soil both qualitatively and quantitatively. The diversity of PLFA in the tobacco soils was tested. The PLFA data was analyzed, using Shannon-wiener (H_1), Brillouin (H_2) and McIntosh (H_3) diversity indices, the abundance (S), Pielou evenness (J) and Simpson indices (D). The result of the ecological evaluation showed that: 43 PLFAs in total were detected in soils during the whole growing periods of tobacco. Total PLFAs reached the highest in soils that were collected after growing tobacco for 90 days. The 43 PLFAs biomarkers tested could be divided into 5 groups by means of the cluster analysis according to diversity indices. It was as follows: Group I was characterized with high quantity, high frequency and high diversity for the biomarkers in the soil, the dominant biomarker was 18:1 ω 9c belonging to fungal biomarker; Group II was rich with 16:0, characterized with high frequency and high diversity, belonging to pseudomonas; Group III

基金项目: 福建省财政专项基金资助项目(STIF-Y03); 福建省烟草专卖局科技计划资助项目(闽烟科[2006]18号); 国家科技部重大科技专项资助项目(2008ZX07425-002)

收稿日期: 2008-05-10; 修订日期: 2009-02-24

致谢: 英国洛桑试验站(Rothamsted Research)的 Catriona Macdonald 博士润色英文摘要, 特此致谢。

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: fzliubo@163.com

had 16:1 ω 5c with characteristics of high quantity, high frequency and moderate diversity, belonging to methanotrophs; Group IV had *i*15:0, *a*15:0, *i*16:0 and *a*17:0 which were related to aerobic bacterial biomarkers, 18:1 ω 7c which was anaerobia, 16:0 10Me which was sulfate reducing bacterial PLFA biomarkers, those of PLFA biomarkers were moderate quantity and diversity, high frequency; Group V had *i* 15:0 3OH, 15:1 *i* G, *a*16:0, *i*16:1 G, *i*16:1 H, 17:0, *i*17:0, 15:0 2OH, 15:0 3OH, 17:0 and 17:0 2OH which were aerobic bacteria, 18:3 ω 6c (6,9,12) which was fungus, 17:0 10Me and 18:0 10Me which were actinomycetes, 20:4 ω 6,9,12,15c which was protozoa. Group V PLFAs biomarkers were low quantity, frequency and diversity. Therefore, the order of microbes which played an important role to the tobacco soil properties was fungus, pseudomonas, methanotrophs, aerobic bacteria, anaerobe, and then sulfate reducing bacteria. It could instruct the equitable adjustment of soil microecological system which would be a new method to assess the diversity of microbial community in soils.

Key Words: soil; microbial community; phospholipid fatty acid (PLFA); biomarker; diversity

土壤中的微生物以其丰富的生物多样性使它们成为生态系统中最活跃和最具影响力的组分之一^[1]。其生物多样性,既代表着土壤的生物活性,也反映了土壤生态胁迫机制对其微生物群落的影响。传统研究土壤微生物群落是通过微生物分离方法进行的,不仅工作量大和研究成本高,而且许多微生物是无法人工分离培养的^[2]。引入存在于活体微生物细胞膜的磷脂脂肪酸(phospholipid fatty acid, PLFA),作为微生物的生物标记(biomarker)^[3],用于鉴定土壤微生物种类和识别微生物类群,具有较高的准确性、稳定性和敏感性^[4],被广泛地应用于土壤微生物群落研究^[5,6]。

利用 PLFA 生物标记法研究土壤微生物群落结构变化有过许多报道, Priha 等曾用 PLFA 法对某森林中松树、云杉、桦树下的土壤进行研究,发现不同树种下土壤微生物群落结构明显不同:桦树土壤中华兰氏阴性菌(如假单胞菌)数量很多,松树和云杉土壤中华兰氏阳性菌数量则较多^[7]。用于分析 PLFA 谱图的方法,常见的主要有直接将所测得的 PLFA 用主成分分析(PCA)、部分最小二乘法识别(D-PLS)和群落多余度分析(RDA)等^[8]方法。然而,利用生态学分析方法研究土壤微生物 PLFAs 生物标记多样性、揭示土壤微生物群落功能多样性变化情况,至今尚未见报道,土壤微生物 PLFA 生物标记指示着特定的微生物种群,PLFA 生物标记的多样性代表着微生物群落的多样性,为土壤微生物群落分析提供许多有用的信息。

基于微生物 PLFA 生物标记特异性和多样性特点,本研究拟以烟田土壤为例,应用生态学的观点,借用各生物多样性指标为评价参数,以 PLFA 的数量和结构作为研究对象,结合聚类分析,揭示土壤微生物群落功能的动态变化,为了解烤烟施肥技术对土壤微生物群落多样性的影响提供参考,建立起一种用以评价土壤微生物群落功能多样性的新方法。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试土壤取自福建省烟草农业研究所试验基地。供试烤烟品种为 K326。试验土壤为水稻土,前茬作物为水稻。供试烟田土壤基本理化性状:土壤 pH 值 5.0, 有机质 20.9 g/kg, 碱解 N 99.0 mg/kg, 速效 P 8.8 mg/kg, 速效 K 87.0 mg/kg, 水溶性 Cl 2.0 mg/kg。所用有机肥均为完全腐熟,各种有机肥养分含量:饼肥的全 N 43.0 g/kg, P₂O₅ 28.0 g/kg, K₂O 21.0 g/kg; 鸡粪(福建圣农养鸡场提供)全 N 23.0 g/kg, P₂O₅ 29.0 g/kg, K₂O 34.0 g/kg。

烟草栽培试验自 2007 年 3 月进行,共设不施肥(CK)、施用纯化肥、25% 菜籽饼肥、25% 鸡粪 4 个处理,每处理重复 3 次。田间管理按烟草生产标准进行。取烤烟定植后 0d(基础土样)、30、60d 和 90d 耕作层烟草根际土壤新鲜土样,混匀,进行土壤微生物磷脂脂肪酸的提取和测试分析。

1.2 土壤微生物群落 PLFA 生物标记分析方法

土壤微生物群落结构分析,采用磷脂脂肪酸(PLFA)生物标记法。PLFA 的提取过程和分析参考

Frostegård 和 Kourtev 方法^[9,10], 操作步骤为: 将 20ml 的 0.2mol/L 的 KOH 甲醇溶液和 4g 的新鲜土样加到 50ml 的离心试管中, 混合均匀, 在 37℃ 下温育 1h (磷脂脂肪酸释放, 并甲脂化, 样品 10min 涡旋 1 次)。加入 3ml 1.0mol/L 的醋酸溶液中和 pH 值, 充分摇匀。加 10ml 正己烷, 使 PLFAs 转到有机相中, 600r/min 离心 15min 后, 将上层正己烷转到干净试管中, 在 N₂ 气流下挥发掉溶剂。将 PLFAs 溶解在 1ml 体积分数为 1:1 的正己烷: 甲基丁基醚溶液中, 用作 GC 分析。

采用美国 Agilent6890N 型气相色谱仪, 包括全自动进样装置、石英毛细管柱及氢火焰离子化检测器; 在下述色谱条件下平行分析磷脂脂肪酸混合物标样和待检样本: 二阶程序升高柱温, 170℃ 起始, 5℃/min 升至 260℃, 而后 40℃/min 升温至 310℃, 维持 90s; 汽化室温度 250℃、检测器温度 300℃; 载气为 H₂ (2ml/min)、尾吹气为 N₂ (30ml/min); 柱前压 10.00 psi (1psi = 6.895kPa); 进样量 1μl, 进样分流比 100:1。磷脂脂肪酸 (PLFA) 的鉴定采用美国 MIDI 公司 (MIDI, Newark, Delaware, USA) 开发的基于细菌细胞磷脂脂肪酸成分鉴定的 Sherlock MIS 4.5 系统 (Sherlock Microbial Identification System)。

1.3 数据分析

(1) PLFA 生物标记指纹图谱及其数据利用

将 PLFA 分析结果绘制成指纹谱图, 将相关参数列表。对指纹图谱进行解读和对 PLFA 分析的参数进行说明, 对利用的数据进行归类。

(2) PLFA 生物标记数量结构分析

将分析结果重复处理计算平均值, 构建以 PLFA 生物标记为样本, 以不同处理施肥方法为指标的数据矩阵, 分析特征 PLFA 生物标记在不同施肥处理土壤中的变化, 揭示土壤特征微生物的变化。

(3) PLFA 生物标记生态学参数及其相关性分析

本研究将 PLFA 生物标记作为数量测度, 引入生态学多样性测度 Shannon-Wiener (H_1)^[11,12]、Brillouin (H_2)^[13]、McIntosh (H_3)^[11] 多样性指数、丰富度 (S)^[11,14] 和 Pielou 均匀度 (J)^[11,14]、Simpson 优势度 (D)^[14] 等方法, 计算微生物 PLFA 生物标记生态学参数, 通过相关系数, 分析各参数的相关性。重要生态学参数的计算方法如下:

(1) Shannon-Wiener 多样性指数 (H_1)^[11]

计算公式为:

$$H = - \sum P_i \ln P_i$$

式中, $P_i = N_i/N$, N_i 为处理 i 的特征磷脂脂肪酸个数, N 为该试验中总特征磷脂脂肪酸个数。

(2) Pielou 均匀度 (J)^[11]

计算公式为:

$$J = - \sum P_i \ln P_i / \ln S$$

式中 S 为微生物群落中 PLFA 生物标记出现的频次 (S), 即丰富度。

(3) Simpson 优势度 D ^[14]

计算公式为:

$$D = 1 - \sum P_i^2$$

式中, P_i 种特征磷脂脂肪酸占该试验中总的特征磷脂脂肪酸个数比例。

(4) Brillouin 多样性指数 H_2 ^[13]

计算公式为:

$$H_2 = \frac{1}{N} \lg \left[\frac{N!}{n_1! n_2! \cdots n_i!} \right]$$

式中, n_1 为第 1 个 PLFA 生物标记的个体数量, n_2 为第 2 个 PLFA 生物标记的个体数量, n_i 为第 i 个 PLFA 生物标记的个体数量, N 为所有供试处理中 PLFAs 生物标记出现的个体总和。

(5) McIntosh 多样性指数 H_3 [11]

计算公式为:

$$H_3 = \frac{N - \sqrt{\sum N_i^2}}{N - N\sqrt{S}}$$

式中, N 为特征磷脂脂肪酸总数。

(4) 土壤微生物群落 PLFA 生物标记数聚类分析

以所获得的各 PLFA 生物标记计算出的在不同处理样本中的分布频次 (S)、PLFAs 值总和、Simpson (D)、Shannon-Wiener (H_1)、均匀度 (J)、Brillouin (H_2)、McIntosh (H_3), 并以以上参数为指标, 以磷脂脂肪酸生物标记为样本, 构建分析矩阵。以欧氏距离 (Euclidian Distance) 为聚类分析的尺度, 用最短距离法对矩阵进行系统聚类, 分析利用多样性指标将 PLFA 生物标记归类的结果, 阐明其相似程度。

2 结果与分析

2.1 土壤微生物群落 PLFA 生物标记指纹图谱及其数据利用

试验结果见图 1。图 1 为从土壤样品 Z-7 中所提取的微生物 PLFAs 进样后所得到的气相色谱图, 为该样品中所提取到的总 PLFAs 图谱。其中, 横坐标表示各 PLFA 在气相色谱中出现特征峰的时间, 纵坐标则表示各 PLFA 的峰高。

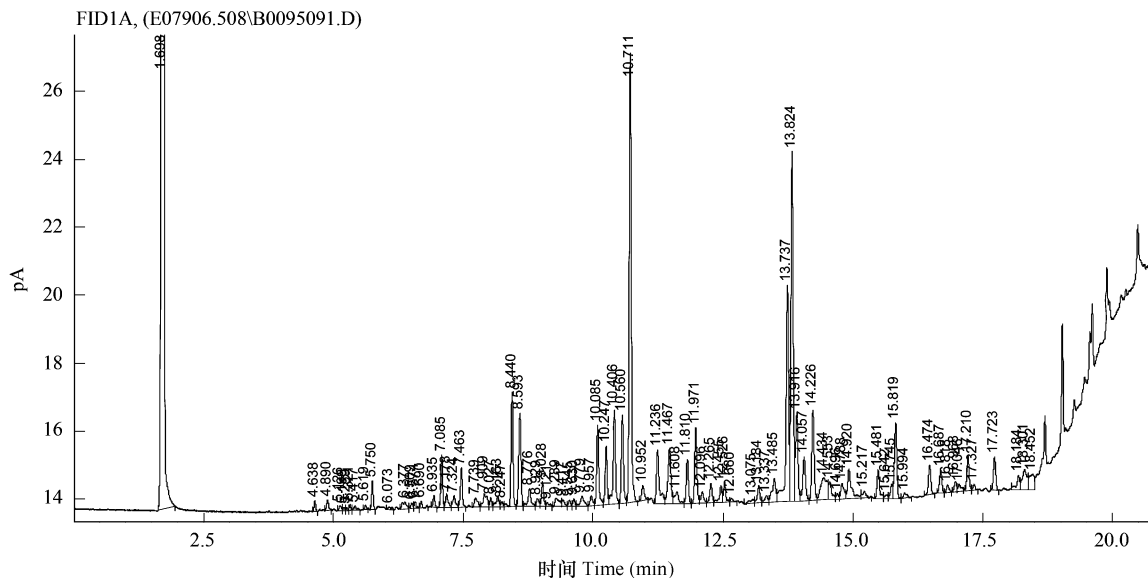


图 1 烟草土壤样品 Z-7 微生物群落磷脂脂肪酸气相色谱图

Fig. 1 Chromatogram profile of phospholipids fatty acids of microbial community in flued-tobacco soil sample Z-7

可将图 1 中的气相色谱图信息进行量化, 转化成数据形式。特定的生物标记指示着特定的微生物。例如, TBSA 10Me18:0 PLFA 为放线菌的特异性生物标记, 其各参数分别为: 特征峰滞留时间 (RT) 值是 14.920min, 特征峰值 (Response) 为 8976, 表示其相对生物量的大小; 面积/峰值比 (Ar/Ht) 为 0.073; 因子相关系数 (RFact) 为 0.879; 该 PLFA 相对链长度 (ECL) 为 18.392; 该 PLFAs 峰名 (Peak Name) 为 TBSA 10Me18:0, 该特征 PLFAs 占总提取的 PLFAs 量的百分数 (Percent) 为 1.98, 其相对链长度的偏离度为 0.000。将研究处理的土样分析结果, 提取 PLFAs 特征峰值, 列表 1 供后续分析。

2.2 土壤微生物 PLFAs 生物标记数量和结构总体变化

(1) PLFAs 生物标记种类数的变化

烟株生长过程中, 所采集的新鲜土样中 PLFAs 种类和特征峰值如表 1 所示。可知, 各处理 PLFAs 的种类随着生长时间而变化, 且总变化趋势一致, 即: PLFAs 种类随生育期的延长呈增加趋势。基础土样 (0d) 中烟

株根际土样 PLFAs 有 14 种,30d 后土样中 PLFAs 达到了 22 种,60d 后达到 24 种,90d 后烟叶成熟,土样 PLFA 达到了 34 种。整个生育期土样 PLFAs 先后共出现了 43 种。

表 1 烟草土壤微生物各 PLFA 的反应值(相对生物量)的动态变化

Table 1 Dynamic changes of the response value (the relative biocontent) of the PLFA biomarkers in soils during in the tobacco growth

PFLAs 序号 PFLAs Code	磷脂脂肪酸 生物标记 PLFAs Biomarker	0d 采样 0 day (basic soils)				30d 采样 30 days collected				60d 采样 60 days collected				90d 采样 90 days collected			
		I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
1	11:0 3OH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1036
2	12:0	0	0	0	0	577	0	626	552	0	0	0	0	776	1161	0	1654
3	13:0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	779
4	i 13:0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	312	523	0	569
5	14:0	603	684	654	810	1914	734	1584	1936	519	382	426	781	4290	3681	3658	5918
6	a14:0	0	0	0	0	1233	353	914	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	i 14:0	0	0	0	0	536	0	456	666	0	0	0	0	1267	1138	982	1591
8	14:1 ω 5c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	663	0	0	2517
9	15:0 2OH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1754	964	1079	0	0	1216	0
10	15:0 3OH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1069	1657	3783
11	a 15:0	906	1070	1182	1210	4034	1378	3230	3920	1532	1220	1689	2911	8808	8191	8284	16581
12	i 15:0	1184	1761	1644	1961	4898	1761	3672	5202	2022	1482	1763	2897	14109	11735	14626	17687
13	i 15:0 3OH	0	0	0	561	0	0	0	0	1051	1816	1790	2319	1045	1205	2940	3221
14	i 15:1 G	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	454	1013	310	2290
15	16:0	5506	7313	6300	9619	22809	7526	17102	25592	16229	13133	14470	21560	64434	49869	71562	73913
16	16:0 10 methyl	636	767	897	1106	2730	756	1682	2301	1725	999	1358	2063	8843	6646	10022	13083
17	a 16:0	0	0	372	0	1951	749	1483	1152	1292	1272	1699	2257	2921	3097	3391	9304
18	i 16:0	684	877	964	1315	3195	1137	2347	3705	2108	1380	1793	2980	12176	9051	10494	13762
19	16:0 N alcohol	0	0	0	549	759	0	0	521	668	469	551	866	1026	914	1218	2052
20	16:1 2OH	0	0	0	0	1082	0	0	0	995	713	0	889	3098	0	3244	3452
21	i 16:1 G	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1290	2964
22	i 16:1 H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1332	1261	0	0
23	16:1 ω 5c	785	1049	1060	1357	3519	1628	2867	3189	3156	4223	3828	5734	8908	8747	19059	15122
24	17:0	0	0	0	0	1152	0	480	1019	1178	0	0	1124	2873	2210	3933	3372
25	17:0 10 Me	0	0	0	0	771	0	517	789	556	390	429	589	2831	1759	2896	3422
26	17:0 2OH	0	0	0	0	1172	0	0	0	0	0	0	0	861	1394	0	1025
27	a17:0	0	589	845	1343	3094	854	1989	3049	1879	2508	2238	3555	7292	6171	8678	13170
28	cy17:0	0	571	0	0	1250	0	614	1750	489	0	528	688	3091	2502	3604	3650
29	i 17:0	0	557	626	784	1912	549	1245	2091	1525	977	1230	1720	6190	5013	7818	7610
30	17:1 ω 8c	0	0	0	0	0	0	0	1025	0	0	0	0	2014	1698	2131	2396
31	18:0	1203	1412	1489	2353	5017	1730	3517	5602	3829	3206	3395	4886	14104	11713	15464	16738
32	18:1 ω 7c	1362	3063	1685	2413	6324	1782	6172	6663	3439	3536	3291	5126	13977	11051	15604	16235
33	18:1 ω 9c	4483	7233	4799	9092	20424	5639	19536	24457	15351	13110	14015	19250	57235	45059	56734	63222
34	18:3 ω 6c (6,9,12)	0	0	425	831	1139	539	728	894	869	929	1076	1185	2897	2640	3722	6839
35	19:0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1159	0	1028	1083
36	cy 19:0 w8c	1122	1806	1465	2008	5144	1233	3205	5574	2802	3127	2809	3781	14455	9892	13781	14402
37	20:0	0	663	584	931	1780	0	1301	1730	1579	1520	1397	1990	5508	3988	5742	6009
38	20:1 ω 9c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1370	635	2289	929
39	20:4 ω 6,9,12,15c	0	378	0	631	1055	0	1262	1679	1027	1129	674	1787	3947	3380	5627	4326
40	a 17:1 ω 9c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1368	0	0	0
41	18:0 10Me	0	0	0	0	0	0	0	2704	1777	1741	1563	2021	5219	0	7167	8976
42	unknown 14.502	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	575	701	418	838
43	unknown 18.814	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	785

I、II、III和IV分别表示不施肥(CK)、施纯化肥、施用25%饼肥和施用25%鸡粪处理 I, II, III and IV were the treatments of unfertilization (control), chemical fertilizer, 25 percent soybean manure and 25 percent chicken manure, respectively

(2) PLFA 生物标记量的变化

PLFAs 生物量随着生育期的延长也皆呈递增的趋势,尤其到了烟株生长后期 PLFAs 的生物量急剧上升。各特征 PLFA 含量大小,因处理和时间又有所不同(表 1),如:属于真菌的 PLFA 18:1 ω 9c^[15],其生物含量在烟草生长末期根际土样中达到了最高值,各处理的含量大小顺序依次为:25% 鸡粪(63222) > 不施肥(57235) > 25% 饼肥(56734) > 纯化肥(45059);属于假单胞菌的 PLFA 16:0^[19],其生物含量也在烟草生长末期达到了最高值,各处理的含量大小顺序依次为:25% 鸡粪(73913) > 25% 饼肥(71562) > 不施肥(64434) > 纯化肥(49869);属于甲烷氧化菌的 PLFA 16:1 ω 5c^[6],其生物含量也在生长末期达到了最高值,各处理的含量大小顺序依次为:25% 饼肥(19059) > 25% 鸡粪(15122) > 不施肥(8908) > 纯化肥(8747)。

(3) PLFA 生物标记分布结构的变化

从土壤中提取到的 43 种 PLFAs 生物标记,指示着不同类群的微生物,包括细菌、真菌、放线菌、原生生物等(表 1)。不同 PLFA 生物标记在土壤的分布可分为 4 种类型:(1)生物标记数量小,在各处理中分布不完全,如 12:0 指示着细菌,相对生物量在 0 到 1654,同时仅在特定的处理中分布;(2)生物标记数量小,在各处理中分布为完全分布,如 14:0 指示着细菌,相对生物量在 519 到 5918,但在各处理中皆有分布;(3)生物标记数量大,在各处理中分布为不完全,如 18:0 10Me 指示着放线菌,数量在 1854 ~ 10315 之间,仅在特定的处理中分布;(4)生物标记数量大,在各处理中的分布为完全分布,如 16:0 指示着细菌,数量在 31320 ~ 107126 之间,在各处理中皆有分布。

2.3 土壤特征微生物 PLFA 生物标记数量和结构变化

(1) 特征微生物 PLFA 生物标记的结构变化

从图 2 可知,对于表征土壤中各大类微生物的特征 PLFAs 标记而言,其大小顺序为:细菌的特征标记 i16:0^[1] 相对生物量(405408)大于表征真菌的 18:1 ω 9c^[15](360420)大于表征放线菌的 10Me 18:0^[1](29178)大于原生动物 20:4 ω 6,9,12,15c^[6](25146)。

(2) 不同施肥处理组特征微生物 PLFA 生物标记的结构变化

从图 3 可知,不同处理对各大类土壤 PLFAs 相对生物量的影响不同,但趋势相似,表征土壤中各大类微生物的特征 PLFAs 的细菌 i16:0、真菌 18:1 ω 9c、放线菌 10Me 18:0 和原生动物 20:4 ω 6,9,12,15c 的相对生物量较为一致,皆为施用 25% 鸡粪 > 25% 饼肥 > 不施肥(对照) > 施用化肥处理。

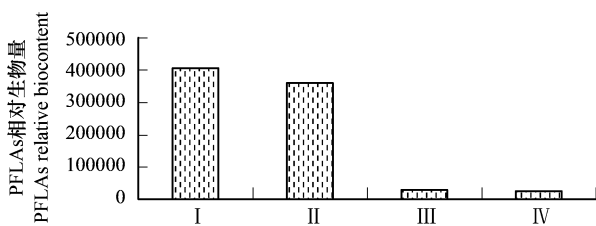


图 2 微生物类群主要特征微脂脂肪酸 PLFA 相对生物含量

Fig. 2 The relative biocontent of dominant PLFA in microbial communities varieties

I: 细菌 16:0 bacteria 16:0; II: 真菌 18:1 ω 9c fungus 18:1 ω 9c; III: 放线菌 18:0 10Me actinomycete 18:0 10Me; IV: 原生动物 20:4 ω 6,9,12,15c protozoa 20:4 ω 6,9,12,15c

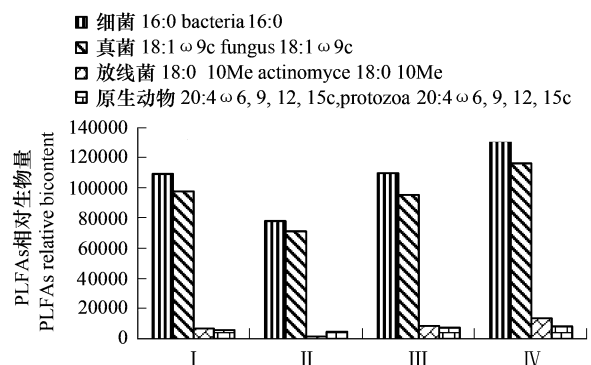


图 3 施肥处理对主要 PLFAs 的影响

Fig. 3 The effects of fertilization treatments on dominant PLFAs biocontent

I: 不施肥 (CK) unfertilization (control); II: 化肥 chemical fertilizer only; III: 25% 菜籽饼肥 25% soybean manure; IV: 鸡粪 25% 25% chicken manure

2.4 土壤微生物群落 PLFA 生物标记生态学参数及其相关性

土壤微生物群落 PLFA 生物标记的多样性、丰富度、均匀度及优势度指数统计结果见表 2。从表中可知,

表 2 土壤微生物群落 PLFAs 生物标记反应值及各多样性指数

Table 2 The diversity indices and total response value of the PLFAs biomarkers of the microbial community in the tobacco soils

序号 Code	PLFAs 名 PLFAs Name	频次 <i>S</i> Freq.	PLFA response 值总和 PLFA response total value	Simpson <i>D</i>	Shannon- Wiener <i>H</i> ₁	均匀度 <i>J</i> Evenness	Brillouin <i>H</i> ₂	McIntosh <i>H</i> ₃
1	11:0 3OH	1	1036	0.5000	0	1	0.5	0.1
2	12:0	6	5346	0.8002	2.4535	0.9491	2.4480	0.5605
3	13:0	1	779	0.5000	0.0000	1	0.5	0.1
4	<i>i</i> 13:0	3	1404	0.6481	1.5410	0.9723	1.5334	0.4175
5	14:0	16	28574	0.8850	3.4706	0.8676	3.4673	0.6647
6	<i>a</i> 14:0	3	2500	0.6034	1.4325	0.9038	1.4279	0.3776
7	<i>i</i> 14:0	7	6636	0.8336	2.6858	0.9567	2.6804	0.5992
8	14:1 ω 5c	2	3180	0.3302	0.7386	0.7386	0.7368	0.1848
9	15:0 2OH	4	5013	0.7356	1.9602	0.9801	1.9565	0.4926
10	15:0 3OH	3	6509	0.5705	1.3855	0.8742	1.3836	0.3489
11	<i>a</i> 15:0	16	66146	0.8738	3.4089	0.8522	3.4073	0.6473
12	<i>i</i> 15:0	16	88404	0.8772	3.4005	0.8501	3.3993	0.6517
13	<i>i</i> 15:0 3OH	9	15948	0.8630	2.9990	0.9461	2.9958	0.6348
14	<i>i</i> 15:1 G	4	4067	0.6028	1.6022	0.8011	1.5980	0.3755
15	16:0	16	426937	0.8899	3.5127	0.8782	3.5124	0.6692
16	16:0 10 Me	16	55614	0.8632	3.2994	0.8248	3.2976	0.6328
17	<i>a</i> 16:0	13	30940	0.8585	3.2557	0.8798	3.2531	0.6274
18	<i>i</i> 16:0	16	67968	0.8739	3.3677	0.8419	3.3662	0.6473
19	16:0 N alcohol	11	9593	0.8865	3.3066	0.9558	3.3004	0.6698
20	16:1 2OH	7	13473	0.8045	2.5386	0.9043	2.5357	0.5626
21	16:1 i G	2	4254	0.4227	0.8852	0.8852	0.8838	0.2439
22	16:1 i H	2	2593	0.4998	0.9995	0.9995	0.9972	0.2985
23	16:1 ω 5c	16	84231	0.8786	3.4359	0.8590	3.4347	0.6539
24	17:0	9	17341	0.8497	2.9162	0.9199	2.9132	0.6169
25	17:0 10 Me	11	14949	0.8493	3.0207	0.8732	3.0166	0.6168
26	17:0 2OH	4	4452	0.7424	1.9777	0.9888	1.9736	0.4998
27	<i>a</i> 17:0	15	57254	0.8799	3.4129	0.8736	3.4112	0.6561
28	<i>cy</i> 17:0	11	18737	0.8621	3.0865	0.8922	3.0831	0.6332
29	<i>i</i> 17:0	15	39847	0.8732	3.3392	0.8547	3.3369	0.6471
30	17:1 ω 8c	5	9264	0.7872	2.2710	0.9781	2.2682	0.5442
31	18:0	16	95658	0.8909	3.5202	0.8801	3.5191	0.6718
32	18:1 ω 7c	16	101723	0.9003	3.6056	0.9014	3.6045	0.6864
33	18:1 ω 9c	16	379639	0.8952	3.5509	0.8877	3.5506	0.6774
34	18:3 ω 6c (6,9,12)	14	24713	0.8626	3.2996	0.8667	3.2963	0.6333
35	19:0	3	3270	0.6661	1.5832	0.9989	1.5796	0.4295
36	<i>cy</i> 19:0 ω 8c	16	86606	0.8902	3.5149	0.8787	3.5137	0.6708
37	20:0	14	34722	0.8876	3.4315	0.9013	3.4291	0.6683
38	20:1 ω 9c	4	5223	0.6929	1.8407	0.9204	1.8372	0.4519
39	20:4 ω 6,9,12,15c	13	26902	0.8765	3.2968	0.8909	3.2940	0.6525
40	<i>a</i> 17:1 ω 9c	1	1368	0.5000	0.0000	1	0.5	0.1
41	18:0 10Me	8	31168	0.8156	2.6831	0.8944	2.6815	0.5738
42	未知 unknown 14.502	4	2532	0.7353	1.9556	0.9778	1.9490	0.4951
43	未知 unknown 18.814	1	1368	0.5000	0.0000	1	0.5	0.1

不同的 PLFAs,其各生态学参数值不同。烟株根际土壤微生物群落 PLFAs 生物标记共检测到 43 个,各生物标记在各处理中出现的频次 1~16,生物标记含量总和范围在 779-426937,5 个生态学参数 Simpson (D)、Shannon-Wiener (H_1)、均匀度 (J)、Brillouin (H_2) 和 McIntosh (H_3) 指数变化范围分别为 0.5000~0.9003、0~3.6056、0.7386~1.0000、0.5~3.5124、0.1000~0.6698。

烟株根际土壤中 PLFA 生物标记各生态学参数之间的相关系数见表 3。从表 3 可知,PLFAs 的频次 (S) 与 Simpson (D)、Shannon-Wiener (H_1)、Brillouin (H_2) 和 McIntosh (H_3) 指数具有较好的正相关关系,其相关系数分别为:0.86、0.92、0.95 和 0.86;Simpson (D) 与 Shannon-Wiener (H_1)、Brillouin (H_2) 和 McIntosh (H_3) 指数也具有较好的正相关关系,其相关系数分别为:0.95、0.96 和 0.96;Shannon-Wiener (H_1) 与 Brillouin (H_2) 和 McIntosh (H_3) 指数皆呈高度正相关关系,其相关系数分别为:0.99 和 0.99;Brillouin (H_2) 与 McIntosh (H_3) 指数之间也呈高度正相关关系,其相关系数为 0.97。而 PLFA 生物标记反应值与其它各多样性指数之间皆呈正相关(除均匀度 (J) 外),但相关度不高;均匀度 (J) 与其它各多样性指数之间皆呈负相关,相关度也不高。分析结果表明,反映烟株根际土壤中 PLFA 生物标记各生态学参数可以选用 PLFA 的频次 (S)、PLFA 生物标记反应值、均匀度 (J)、Shannon-Wiener (H_1)。

表 3 PLFAs 生物标记反应值及各多样性指数相互之间的相关性

Table 3 The relationships among diversity indices and total response value of PLFAs biomarkers

项目 Items	频次 S Freq.	PLFAs 反应值 PLFA response value	Simpson D	Shannon- Wiener H_1	均匀度 J Evenness	Brillouin H_2	McIntosh H_3
频次 S Freq.	1.00	0.54	0.86	0.92	-0.55	0.95	0.86
PLFA 值总和 PLFA total value	0.54	1.00	0.39	0.44	-0.26	0.45	0.39
Simpson D	0.86	0.39	1.00	0.95	-0.24	0.96	0.96
Shannon-Wiener H_1	0.92	0.44	0.95	1.00	-0.47	0.99	0.99
均匀度 J Evenness	-0.55	-0.26	-0.24	-0.47	1.00	-0.45	-0.38
Brillouin H_2	0.95	0.45	0.96	0.99	-0.45	1.00	0.97
McIntosh H_3	0.86	0.39	0.96	0.99	-0.38	0.97	1.00

2.5 功能 PLFA 生物标记多样性指数的变化

PLFAs 生物标记所指示的功能微生物群落多样性指数变化差异很大,对于细菌而言,重要功能菌生物标记,如:标记甲烷氧化菌的 16:1 ω 5c^[6]、硫酸盐还原细菌的 16:0 10Me^[1] 和厌氧菌的 18:1 ω 7c^[1] 在供试的 16 个土样中均出现过;真菌的 PLFA 18:1 ω 9c^[15] 也均在供试的 16 个土样中出现,这些主要标记物在供试土壤中丰富度皆相对较高,如表 2 所示,可知其 Response 值总和较高,均匀度 (J) 较低,其 Simpson 优势度指数 (D)、Shannon-Wiener (H_1)、Brillouin (H_2) 和 McIntosh (H_3) 多样性指数也相对较高。

2.6 土壤微生物 PLFA 生物标记的聚类分析

将表 2 中以各 PLFA 生物标记各参数值为指标,以各 PLFA 为样本,构建分析矩阵,并以欧氏距离为尺度,用最小距离法进行系统聚类,结果见图 4。结果表明,当 $\lambda = 6662.14$,可将其分成五大类。各类 PLFAs 生物标记相对生物量大小顺序为: I 类 > II 类 > III 类 > IV 类 > V 类。

第 I 类 特点为 PLFAs 生物标记含量高,在样方中分布的频次较高,多样性指数高;属于该类的 PLFA 为 18:1 ω 9c,表征真菌^[15],在各处理样方中的 PLFA 相对生物量为 379639,在样方中分布的频次为 16,多样性指数 Shannon-Wiener 为 3.5509;代表着主导真菌的属性。

第 II 类 其特点为 PLFA 生物量高,在样方中分布的频次也较高,多样性指数高;16:0,表征假单胞菌^[19],PLFA 相对生物量为 426937,在样方中分布的频次为 16,多样性指数 Shannon-Wiener 为 3.5127,代表着主导细菌的属性。

第 III 类 特点为 PLFA 生物量高,在样方中分布的频次较高,多样性中等;属于该类的 PLFA 为 16:1 ω 5c,

在样方中分布的频次为 16,多样性指数 Shannon-Wiener 为 3.4359,表征甲烷氧化菌的 PLFA 生物标记^[5],在各处理样方中的 PLFA 相对生物量为 84231,说明土壤中也含有较多的甲烷氧化菌。

第IV类 特点为 PLFA 生物标记含量中等,在样方中分布的频次较高,多样性中等;属于该类的 PLFAs 有序号 *i15:0*、*cy19:0 ω 8c*、*18:0*、*18:1 ω 7c*、*a15:0*、*i16:0*、*16:0 10Me*、*a17:0*。其中,已知 *i15:0*、*a15:0*、*i16:0* 和 *a17:0* 可用于表征革兰氏阳性菌^[1],且也是好氧菌的生物标记;*18:0*、*18:1 ω 7c* 和 *cy19:0 ω 8c* 可用于表征革兰氏阴性菌,且 *18:1 ω 7c* 为厌氧细菌^[1]的生物标记;*16:0 10Me* 也可用于表征硫酸盐还原细菌^[1]。

第V类 特点为 PLFAs 含量低,在样方中分布的频次较低,多样性低;属于该类的 PLFA 有 *11:0 3OH*、*12:0*、*13:0*、*i13:0*、*14:0*、*a14:0*、*i14:0*、*14:1 ω 5c*、*15:0 2OH*、*15:0 3OH*、*15:0 i 3OH*、*15:1 i G*、*a16:0*、*16:0 N alcohol*、*16:1 2OH*、*i16:1 G*、*i16:1 H*、*17:0*、*17:0 10Me*、*17:0 2OH*、*cy17:0*、*i17:0*、*17:1 ω 8c*、*18:3 ω 6c* (6,9,12)、*19:0*、*20:0*、*20:1 ω 9c*、*20:4 ω 6*, 9, 12, 15c、*a17:1 ω 9c*、*10Me 18:0*、unknown 14.502、unknown 18.814。其中,已知 *a14:0*、*i14:0*、*14:0*、*15:0 i 3OH*、*15:1 i G*、*a16:0*、*16:1 2OH*、*i16:1 G*、*i16:1 H*、*17:0*、*i17:0* 可用于表征革兰氏阳性菌^[1],且 *15:0 i 3OH*、*15:1 i G*、*a16:0*、*i16:1 G*、*i16:1 H*、*17:0*、*i17:0* 也是好氧细菌的生物标记^[1]; *15:0 2OH*、*15:0 3OH*、*a16:0*、*16:0 N alcohol*、*16:1 2OH*、*17:0*、*17:0 2OH*、*cy17:0* 可用于表征革兰氏阴性菌^[1],且 *15:0 2OH*、*15:0 3OH*、*17:0*、*17:0 2OH* 也可用于表征好氧菌^[1]; *18:3 ω 6c* (6,9,12) 可用于表征真菌的生物标记^[1]; *17:0 10Me* 和 *10Me 18:0* 可用于作为表征放线菌的生物标记^[1]; *20:4 ω 6*, 9, 12, 15c 可用于作为表征原生动物的生物标记^[6]。

3 小结与讨论

目前常用于进行微生物群落多样性分析的方法,主要有磷脂脂肪酸(PLFA法)、生理学(Biolog法)、分子生物学(DGGE、T-RFLP、qPCR等)等方法^[15-17],但磷脂脂肪酸(PLFA)法更敏感^[3],能够快速、直接、较全面、有效地提供土壤微生物群落的信息,且试验条件要求较低,结果较为客观、可靠^[4,6]。因此,磷脂脂肪酸(PLFA)生物标记法是目前较为流行的测定微生物生物量的一种新方法。

磷脂脂肪酸(PLFA)生物标记法,主要根据不同类群微生物的指示 PLFAs 不同,通过提取和分离通过不同的生化途径合成的细胞膜 PLFAs,其在高度专一性基础上具有多样性,可作为微生物群落中不同群体的生物标记^[8],并测定它们的含量,定量地反映可繁殖或有潜在繁殖能力的不同类群微生物生物量和总生物量,是一种较好的评价广谱群落差异的分析方法。特别是磷脂脂肪酸,具有属的特异性,特殊的甲基磷脂脂肪酸已经被作为微生物分类的依据。由于 PLFAs 在死亡后微生物中很快被分解,所以,能够很好地测定有繁殖能力的微生物生物量。但 PLFA 方法也还存在一些缺点,如,尚未确立土样中所有生物的特征磷脂脂肪酸且无法对古菌进行分析;在很多情况下,还无法完全确定土样中某些特定 PLFA 与特定微生物或微生物群落的对应关系^[4,6]。

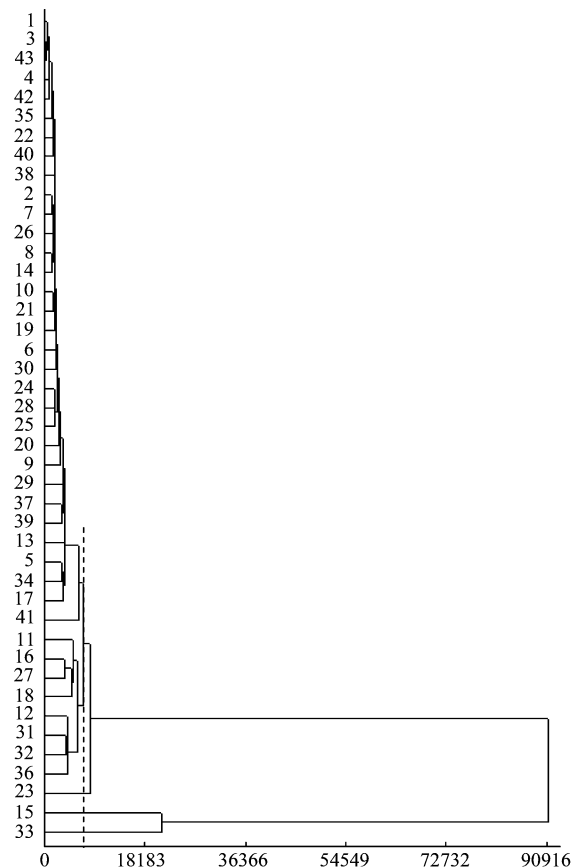


图4 微生物群落 PLFAs 生物标记各生态学指数聚类分析
Fig.4 Cluster analysis of PLFAs ecological indices value of microbial community

土壤微生物群落结构,受土地使用历史、植被覆盖类型和作物栽培方式等多种因素的影响^[4,6,8]。在烟草的生长过程中,其根际土壤微生物群落结构多样性还受田间管理方式,包括施肥方法和类型、生育期等方面的影响,烟草植株或其分泌物与根际土壤微生物的互作对土壤微生物群落多样性也起着重要作用^[18]。测定结果表明,本试验所获得的 43 种 PLFAs 生物标记各多样性指数、丰富度及均匀度皆不相同,且不同生长阶段的 PLFAs 各多样性测度指数皆不相同。本研究中以各 PLFA 为样本、各多样性指数为指标,进行聚类,所得的结果是各 PLFA 在土壤微生物群落 PLFAs 总体中所起的影响,其结果比单一因素的聚类分析或主成份分析方法更全面和综合,在实际应用中更具可行性。

因此,本试验条件下,在整个烟草生长过程的土壤微生物群落中,起主导作用的功能菌依次是真菌、假单胞菌、甲烷氧化菌和部分的好氧菌、厌氧细菌及硫酸盐还原细菌,影响最小的可能是一些好氧菌、放线菌及原生动物。由此可以推出,若要调控土壤微生态系统中的生物群落对土壤肥力及各种抗逆能力的影响,我们应该首先着重研究该土壤中的真菌和假单胞菌的生理生化性质,并据此提出解决的方法。这将对生产上合理调节土壤微生态系统的功能提供指导,也可为其它土壤微生物群落功能多样性的研究提供一种新的思路与研究方法。

References:

- [1] Chen Z X, Yu X, Xia M F, *et al.* 2005. Application of phospholipid fatty acid (PLFA) analysis in microbial ecology. *Chinese Journal of Ecology*, 24(7):828—832.
- [2] Zhang H X, Wang X Y, Qi H Y. Development in research methods of microbial ecology. *Acta Ecologica Sinica*, 2003, 23(5): 988—995.
- [3] Wang S G, Hou Y L. Application of phospholipids fatty acid method in soil microbial analysis. *Microbiology*, 2004, 31(1): 114—117.
- [4] Bai Z, He H B, Zhang W, *et al.* PLFAs technique and it's application in the study of soil microbiology. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(7):2387—2394.
- [5] Kaur I A, Chaudhary A, Kaur I A, *et al.* Phospholipid fatty acid — A bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystem. *Current Science*, 2005, 89, (7):1102—1112.
- [6] Yan H, Cai Z C, Zhong W H. PLFA analysis and its applications in the study of soil microbial diversity. *Acta Pedologica Sinica*, 2006, 43(5):851—859.
- [7] Priha O, Susan J, *et al.* Microbial community structure and characteristics of the organic matter in soils under *Pinus sylvestris*, *Picea abies* and *Betula pendula* at two forest sites. *Biol. Fertil. Soils*, 2001, 33:17—24.
- [8] Qi H Y, Xue K, Zhang H X. Phospholipid fatty acid analysis and its applications in microbial ecology. *Acta Ecologica Sinica*, 2003, 23(8):1576—1582.
- [9] Frostegård A, Tunlid A, Baat E. Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Appl. Environ. Microb.*, 1993, 59:3605—617.
- [10] Kourtev P S, Ehrenfeld J C, Häggelom M. Exotic plant species alter the microbial community structure and function in the soil. *Ecology*, 2002, 83(11):3152—3166.
- [11] Ge F. *Modern ecology*. Beijing: Science Publishing House, 2002. 252—254.
- [12] Magurran A E. *Ecological diversity and its measurement*. Princeton, N. J.: Princeton University Press, 1988. 141—162.
- [13] Zhang Y B, Wang X L, Fan M Z, *et al.* Diversity of entomogenous fungi and their hosts and population dynamics of the fungi in a Masson's pine plantation ecosystem. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2007, 34(3):342—347.
- [14] Sun H X, Liu X L. Microbes studies of tea rhizosphere. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(7):1353—1357.
- [15] Jared L. DeForest, Donald R. Zak, Kurt S. Pregitzer, *et al.* Atmospheric nitrate deposition, microbial community composition, and enzyme activity in Northern Hardwood Forests. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 2004, 68:132—138.
- [16] Philip W R, Matthias C R, Kevin P F, *et al.* Choice of methods for soil microbial community analysis: PLFA maximizes power compared to CLPP and PCR-based approaches. *Pedobiologia*, 2006, 50: 275—280.
- [17] Heribert Insam. Developments in soil microbiology since the mid 1960s. *Geoderma*, 2001, 100:389—402.
- [18] Zhan F D, Lu Y G, Guan G J, *et al.* Community structures of microorganisms and their dynamics in the rhizosphere of flue-cured tobacco. *Acta*

Pedologica Sinica, 2005, 42(3): 488—494.

[19] Teng Y, Luo Y M, Li Z G. Microbial diversity in polluted soils; an overview. *Acta Pedologica Sinica*, 2006, 43(6): 1018—1026.

参考文献:

- [1] 陈振翔, 于鑫, 夏明芳, 等. 磷脂脂肪酸分析方法在微生物生态学中的应用. *生态学杂志*, 2005, 24(7): 828~832.
- [2] 张洪勋, 王晓谊, 齐鸿雁. 微生物生态学研究方法进展. *生态学报*, 2003, 23(5): 988~995.
- [3] 王曙光, 侯彦林. 磷脂脂肪酸方法在土壤微生物分析中的应用. *微生物学通报*, 2004, 31(1): 114~117.
- [4] 白震, 何红波, 张威, 等. 磷脂脂肪酸方技术及其在土壤微生物研究中的应用. *生态学报*, 2006, 26(7): 2387~2394.
- [6] 颜慧, 蔡祖聪, 钟文辉. 磷脂脂肪酸分析方法及其在土壤微生物多样性研究中的应用. *土壤学报*, 2006, 43(5): 851~859.
- [8] 齐鸿雁, 薛凯, 张洪勋. 磷脂脂肪酸谱图分析方法及其在微生物生态学领域的应用. *生态学报*, 2003, 23(8): 1576~1582.
- [11] 戈峰. 现代生态学. 北京: 科学出版社, 2002. 252~254.
- [13] 张玉波, 王晓蕾, 樊美珍, 等. 马尾松林生态系中虫生真菌及其寄主的多样性和消长动态的研究. *安徽农业大学学报*, 2007, 34(3): 342~347.
- [14] 孙海新, 刘训理. 茶树根际微生物研究. *生态学报*, 2004, 24(7): 1353~1357.
- [18] 湛方栋, 陆引罡, 关国经, 等. 烤烟根际微生物的群落结构及其动态变化的研究. *土壤学报*, 2005, 42(3): 488~494.
- [19] 滕应, 骆永明, 李振高. 污染土壤的微生物多样性研究. *土壤学报*, 2006, 43(6): 1018~1026